

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД ДЛЯ ОБОСНОВАНИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ НЕЙРОПРОТЕКТИВНОЙ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ НАСЛЕДСТВЕННЫМИ НЕРВНО-МЫШЕЧНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

М.Г. Соколова¹, Е.В. Лопатина^{2, 3}, В.А. Пеннийнен³

*¹Северо-Западный государственный медицинский университет
им. И.И. Мечникова, С-Петербург, sokolova.m08@mail.ru*

*²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, С-Петербург*

³Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, С-Петербург

Наследственные нервно-мышечные болезни – группа генетических заболеваний, манифестирующих в большинстве случаев в детском возрасте, имеющих неуклонно прогрессирующее течение патологического процесса, приводящее к быстрой инвалидизации больных и имеющих высокую летальность в возрасте 18-20 лет. К наиболее распространенным формам наследственных нервно-мышечных болезней нервной системы относятся прогрессирующие амиотрофии (спинальная мышечная атрофия и наследственная моторная и сенсорная невропатия) и прогрессирующие миодистрофии (мышечная дистрофия Дюшенна) До настоящего времени эти заболевания являются неизлечимыми, а применение традиционных подходов, направленных на усиление репаративных и протективных

процессов в нервной ткани, к сожалению, не имеют научного обоснования. Они возникают вследствие различных мутаций, которые клинические проявляются развитием миопатического синдрома. По нашему мнению, гибель большой популяции клеток у детей с данными заболеваниями, из-за генетических дефектов создает специфическую внутриорганный среду вследствие активации антиапоптотических регулирующих пептидов, к которым также относятся нейротрофические факторы.

Оценить состояние внутриорганной среды и дать рекомендации для дальнейшего лечения позволяют использование тест-системы разработанной на основе органотипической культуры нервной ткани.

Цель исследования: изучить влияние плазмы крови больных наследственными мышечными атрофиями и мышечными дистрофиями используя тестирование в органотипической культуре нервной ткани для обоснования назначения симптоматической нейропротективной терапии.

Материалы и методы: было обследовано 90 больных наследственными нервно-мышечными заболеваниями (спинальные мышечные атрофии 1, 2 и 3 типа (n=30), мышечная дистрофия Дюшенна (n=60)); группа контроля – 30 здоровых человек. In vitro – эксплантаты сенсорных ганглиев 10-12 суточных куриных эмбрионов. Проведено комплексное клиничко-лабораторное и экспериментальное исследование. Концентрации нейротрофических факторов (ФРГМ, ФРН, ЦНТФ) определяли иммуноферментным методом в образцах плазмы крови с использованием наборов фирмы RayBiotech, Inc и в соответствии с инструкциями производителя.

Экспериментальное исследование проведено в лаборатории физиологии возбудимых мембран ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук. Использовали метод органотипической культуры ткани, лазерную сканирующую конфокальную микроскопию. Для исследования нейротрофических свойств плазмы крови у больных производили забор венозной крови натощак в утренние часы в объеме 5 мл. Центрифугировали, отделившуюся плазму крови перемещали в эпендорфы и замораживали при температуре -80°C . Влияние плазмы крови больных на рост нейритов сенсорных нейронов спинальных ганглиев оценивали в условиях органотипического культивирования с помощью морфометрического критерия индекса площади. В качестве экспериментальной модели использовали 10–12-дневные куриные эмбрионы, из которых выделяли спинномозговые ганглии на уровне пояснично-крестцового отдела позвоночника (L5-S1). Эксплантаты спинальных ганглиев помещали на дно чашки Петри, покрытой коллагеновой пленкой. Каждая чашка Петри содержала по 20-25 эксплантатов. Для прикрепления эксплантатов к коллагеновой подложке закрытые чашки Петри помещали в термостат при температуре $36,8^{\circ}\text{C}$ на 10 минут, затем добавляли питательную среду. При культивировании использовали среды с pH 7,4 следующего состава: 40% – раствора Хенкса; 40% – среды Игла; 15% – сыворотки эмбриональной телячьей, для культур клеток, HyClone; 5% – куриного эмбрионального экстракта; с добавлением глюкозы (0,6%), инсулина (0,5 ед/мл), гентамицина (100 ед/мл), глутамина (0,35%) [Лопатина Е.В. и др., 2015]. Куриный эмбриональный экстракт готовили из 10–12-дневных куриных эмбрионов. Дальнейшее культивирование эксплантатов спинальных ганглиев осуществляли при 37°C и 5% CO_2 в течение 3-х суток в CO_2 -инкубаторе (Sanyo, Япония). Для уточнения биохимических механизмов, участвующих в патологических каскадах при наследственных нервно-мышечных заболеваниях, была разработана тест-система, которая включала в себя последовательное изучение плазмы крови больного в органотипической культуре ткани в разведении 1 : 70 с последующим добавлением в среду реагентов: синтетического фактора роста нерва (ФРН) (100 пг/мл).

Для изучения плазмы крови больного и дальнейшего фармакологического анализа использовали по 25–30 эксплантатов на одну исследуемую концентрацию с учетом того, что экспериментальное исследование состояло из 10 этапов, среднее число эксплантатов

на одного больного составило 250–300 штук. Такое же количество эксплантатов было исследовано при изучении плазмы крови здоровых людей из контрольной группы.

Для получения прижизненной информации о состоянии клеток, формирующих зону роста эксплантатов спинальных ганглиев и ткани сердца, использовали аппаратно-программный комплекс для визуализации, обработки и анализа изображений ZEN_2009 и ZEN_2014 лазерного сканирующего микроскопа LSM-710 (CarlZeiss, Германия). Микроскопические исследования выполнялись на оборудовании Центра коллективного пользования «Конфокальная микроскопия» Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Для визуализации объектов использовали микроскоп «AxiostarPlus» («CarlZeiss», Германия) согласно методике ультрамикроскопии живых объектов [Свищев Г.М., 2011]. Полученные изображения анализировали с помощью программы ImageJ. Статистический анализ осуществлялся с использованием пакета STATISTICA 8.0 (StatSoft®, Inc., USA, 2012).

Результаты исследования. Проведенные исследования позволили обнаружить особенности нейротрофической регуляции у больных с наследственными нервно-мышечными заболеваниями, которые имеют важное значение для проведения симптоматической терапии. Концентрация ФРГМ имела наибольшие значения у больных прогрессирующими амиотрофиями, в то время как у больных прогрессирующими миодистрофиями содержание в крови этого фактора были на уровне, сопоставимом с контрольными данными, причем у части больных концентрация ФРГМ была ниже нормы. Концентрация ФРН имела наибольшие значения в группе больных прогрессирующими амиотрофиями.

Значения индекса площади при изучении плазмы крови больных прогрессирующими амиотрофиями в разведении 1 : 70 был ниже контрольных значений в среднем на 25% и составил $75,5 \pm 7,4\%$, было выявлено достоверное нейрит-ингибирующее действие плазмы крови ($p < 0,001$). Индекс площади в эксплантатах, содержащих плазму крови больных миодистрофиями имел значение $105,0 [102,0; 108,0]\%$, что было меньше значений индекса площади в контрольных эксплантатах $114,0 [113,0; 115,0]$. В разведении 1 : 100 плазмы крови больных прогрессирующими амиотрофиями в органотипической культуре ткани в был отмечен рост нейритов, значения индекса площади составляли $102,0 [100,0; 105,0]\%$. Результаты оценки ИП в исследуемых разведениях были проанализированы с использованием дисперсионного анализа. Получено, что фактор разведения плазмы крови статистически значимо влияет (критерий Краскела–Уоллиса $H = 53,6$; $p < 0,001$) на значение ИП, регистрируемое в опыте. Проведенные исследования показали, что плазма крови больных прогрессирующими амиотрофиями дозозависимо ингибирует рост нейритов спинальных ганглиев, а плазма крови больных миодистрофиями имеет нейрит-ослабленное влияние на рост нейритов.

В серии экспериментов в условиях органотипического культивирования спинальных ганглиев 10–12-дневных куриных эмбрионов в присутствии плазмы крови больных с наследственными нервно-мышечными заболеваниями было установлено, что введение синтетического фактора роста нерва стимулирует рост нейритов в образцах содержащих плазму крови больных мышечной дистрофией Дюшенна и имеет противоположное действие на образцы, содержащие плазму крови больных спинальной мышечной атрофией т.е. плазма крови имеет нейрит-ингибирующее действие. Введение синтетического ФРН (100 пг/мл) в органотипическую культуру ткани, содержащую плазму крови больных миодистрофиями, увеличивало значение индекса площади $114,0 [111,0; 116,0]\%$; в эксплантатах, содержащих плазму крови больных прогрессирующими амиотрофиями, усиление роста нейритов не наблюдалось ИП = $80,0 [74,5; 83,0]\%$. Проведенное статистическое исследование выявило корреляционную связь между уровнем концентрации нейротрофинов (ФРН и ФРГМ) и влиянием плазмы крови на рост нейритов ($p < 0,001$).

Выводы. Использование современных биотехнологий: иммуноферментного метода для определения биологически активных субстанций и метода органотипического культивирования позволяют уточнить патогенез наследственный нервно-мышечных заболеваний и определить направление проведения терапевтических подходов. Впервые зарегистриро-

вано повышенное содержание нейротрофинов ФРН и ФРГМ в плазме крови у больных с поражением двигательного нейрона у больных спинальной мышечной атрофией и снижением ФРГМ у больных с поражением мышечной системы у больных с мышечной дистрофией Дюшенна. Полученные данные свидетельствуют об особенностях нейротрофической регуляции у больных наследственными мышечными атрофиями и мышечными дистрофиями, которые необходимо учитывать при проведении симптоматического лечения, направленного на стимулирование репаративных процессов в нервной ткани. Больным с нейрит-ослабленным действием плазмы крови рекомендовано проводить терапию нейропротективными препаратами, у больных с нейрит-ингибирующим эффектом на нейриты в органотипической культуре нервной ткани рекомендовано проводить подбор препарата в условиях *in vitro* индивидуально путем фармакологического анализа.